

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-134101

(43)Date of publication of application : 23.05.1995

(51)Int.Cl.

G01N 21/64  
C12Q 1/68  
G01N 27/447

(21)Application number : 05-305815

(71)Applicant : HITACHI ELECTRON ENG CO LTD

(22)Date of filing : 11.11.1993

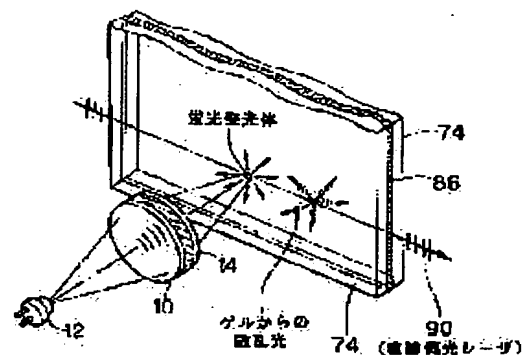
(72)Inventor : NEMOTO RYOJI  
MISHINA YOSHINORI

## (54) DNA BASE SEQUENCE DETERMINING APPARATUS

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To transmit only fluorescent light effectively and surely to a fluorescent light detecting means by putting a P light deflecting plate between a fluorescent light detecting means and an electrophoresis plate and cutting excited light.

**CONSTITUTION:** A fluorescent light detecting means is composed of a converging lens 10 and a light receiving element 12 and a P light deflecting plate 14 is put between the converging lens and an electrophoresis plate 74. The position of the light deflecting plate 14 may be between the lens 10 and the light receiving element 12. The excited laser to be used is linearly deflected laser light with 488nm wavelength and the scattered light at the time the laser light passes a gel electrolytic layer 86 has characteristics as excited light and contains a large quantity of P deflected components. Consequently, only fluorescent light with 520nm wavelength close to that of the laser light can be supplied to the light receiving element 12 by putting the P light deflecting plate 14, which transmits only P deflected light components and cut S deflected light components, and cutting the S deflected light components.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-134101

(43)公開日 平成7年(1995)5月23日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 21/64

A

C 1 2 Q 1/68

9453-4B

G 0 1 N 27/447

G 0 1 N 27/ 26

3 0 1 A

3 2 5 E

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 4 頁)

(21)出願番号

特願平5-305815

(22)出願日

平成5年(1993)11月11日

(71)出願人 000233480

日立電子エンジニアリング株式会社

東京都渋谷区東3丁目16番3号

(72)発明者 根本 亮二

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日

立電子エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 三品 喜典

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日

立電子エンジニアリング株式会社内

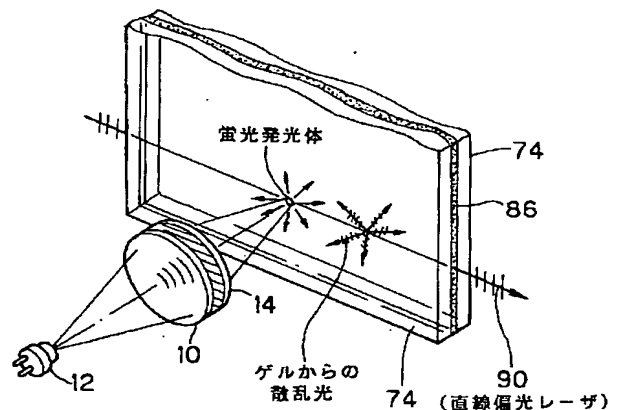
(74)代理人 弁理士 梶山 佑是 (外1名)

(54)【発明の名称】 DNA塩基配列決定装置

(57)【要約】

【目的】 波長の接近した励起光と蛍光から、蛍光波長成分だけを効果的に、かつ、確実に取り出すことができるDNA塩基配列決定装置を提供する。

【構成】 DNA断片用の多数の泳動路を有する、垂直に保持される平板型ゲル電気泳動手段、該電気泳動装置の泳動路に、該電気泳動装置の横方向から該泳動路と直交するように、レーザ光を照射する光励起用のレーザ光照射手段、レーザ光によって照射されたDNA断片から発生された蛍光を検出し電気信号に変換する蛍光検出手段とからなるDNA塩基配列決定装置において、前記蛍光検出手段は偏光板（特に、S偏光成分を遮断する偏光板）を有することを特徴とするDNA塩基配列決定装置。



**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 DNA断片用の多数の泳動路を有する、垂直に保持される平板型ゲル電気泳動手段、該電気泳動装置の泳動路に、該電気泳動装置の横方向から該泳動路と直交するように、レーザ光を照射する光励起用のレーザ光照射手段、レーザ光によって照射されたDNA断片から発生された蛍光を検出し電気信号に変換する蛍光検出手段とからなるDNA塩基配列決定装置において、前記蛍光検出手段は偏光板を有することを特徴とするDNA塩基配列決定装置。

【請求項 2】 偏光板はS偏光成分を遮断する偏光板である請求項 1 のDNA塩基配列決定装置。

【請求項 3】 レーザ光源は、波長 488 nm の直線偏光レーザ光を発生するアルゴンイオンレーザであり、DNA断片を標識するための蛍光体としてFITCを使用し、この蛍光体に前記のレーザ光が照射されると、ここから波長約 520 nm の蛍光が発生される請求項 1 のDNA塩基配列決定装置。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明はDNA塩基配列決定装置に関する。更に詳細には、本発明は蛍光標識を用いてDNAの塩基配列を効率的に迅速に決定することのできる装置に関する。

**【0002】**

【従来の技術】 DNA等の塩基配列を決定する方法として、ゲル電気泳動法が広く実施されている。

【0003】 電気泳動する際に、従来は試料をラジオアイソトープでラベルし、分析していたが、この方法では手間と時間がかかる難点があった。更に、放射能管理の点から常に最大限の安全性と管理が求められ、特別な施設内でなければ分析を行うことができない。このため、最近では、試料を蛍光体でラベルする方式が検討されている。

【0004】 光を用いる方法では、蛍光ラベルしたDNA断片をゲル中を泳動させるが、泳動開始部から、15～20 cm 下方に各泳動路毎に光励起部と光検出器を設けておき、ここを通過するDNA断片を順に計測する。例えば、配列を決定しようとするDNA鎖を鋳型として酵素反応（ダイデオキシ法）による操作で末端塩基種が0 かった種々の長さのDNAを複製し、これらに蛍光体を標識する。つまり、蛍光体で標識されたアデニン（A）断片群、シトシン（C）断片群、グアニン（G）断片群およびチミン（T）断片群を得る。これらの断片群を混合して電気泳動用ゲルの別々の泳動レーン溝に注入し、電圧を印加する。DNAは負の電荷を持つ鎖状の重合体高分子のため、ゲル中を分子量に反比例した速度で移動する。短い（分子量の小さい）DNA鎖ほど早く、長い（分子量の大きい）DNA鎖ほどゆっくりと移動するので、分子量によりDNAを分画できる。

【0005】 特開昭 63-21556 号公報には、レーザで照射される電気泳動装置のゲル上のラインと光ダイオードアレイの配列方向が電気泳動装置内のDNA断片の泳動方向と直角となるように構成されたDNA塩基配列決定装置が開示されている。

【0006】 図 4 は該装置の構成を説明する模式図である。泳動板 74 は 2 枚のガラス板の間に電気泳動用ゲル（例えば、ポリアクリルアミド）を挟み込んでいる。泳動板全体の厚さは約 10 mm 程度であるが、ゲル電解質層自体の厚さは約 1 mm 未満である。泳動板 74 の上端より若干下の位置に櫛歯状のゲル電解質層上端が存在する。この櫛歯状の溝 75 内に蛍光物質で標識されたDNA断片を注入する。

【0007】 図 4 の装置では、光源 70 から出たレーザ光はミラー 72 で反射され、泳動板 74 のゲル中の一定ポイントに横から水平にレーザ光を照射する。ゲル中を泳動してきた蛍光ラベルされたDNA断片 76 がこの照射領域を通過する際、このDNA断片から蛍光が順次放出される。このとき、蛍光放出の水平位置から末端塩基の種類が、また、泳動スタートからの泳動時間の差から断片の長さを、更に、発光波長で検体の識別ができる。各泳動路からの蛍光はレンズ 78 によりイメージインテンシファイヤ 80 の受光部 82 で結像する。この信号は増幅されて光ダイオードアレイ 84 で電気信号に変換されて計測される。計測結果をコンピュータ処理することによって各DNA断片の配列を計算し、目的とするDNAの塩基配列を決定する。

【0008】 図 4 に示された装置は受光系としてイメージインテンシファイヤカメラを使用しているが、イメージインテンシファイヤカメラは非常に高価な光学装置であるばかりか、比較的大型の装置である。このため、図 5 に示されるように、各泳動路 88 の検出位置に蛍光検出手段を個別的に配置した装置が開発された。各蛍光検出手段はフィルタ 100 と集光レンズ 110 と受光素子 120 とから構成されている。フィルタ 100 は励起光やバックグランド光を除去し、蛍光だけを選択的に通過させるためのものであり、集光レンズ 110 はフィルタで濾波された蛍光を受光素子 120 の受光面に合焦させるために使用されている。受光素子 120 はpn接合されたシリコンからなるホトダイオードなどである。符号 86 はゲル電解質層を示す。

【0009】 例えば、このようなDNA塩基配列決定装置において、レーザ光源としてアルゴンイオンレーザを使用する場合、レーザ光の波長は約 488 nm である。また、DNA断片を標識するための蛍光体として、FITCを使用する場合、この蛍光体に前記のレーザ光が照射されると、ここから波長約 520 nm の蛍光が発生される。従って、前記フィルタ 100 はこの波長 520 nm の蛍光だけを通過させ、それ以外の波長の迷光あるいはバックグランド光などを除去できるものが好ましい。

このようなフィルタは例えば、誘電体多層膜コーティングフィルタなどである。

【0010】しかし、図6に示すように、励起光の波長と蛍光体の波長が接近しているので、励起光の波長だけを確実に、しかも効果的にカットできるフィルタの製作は実際には非常に困難である。誘電体多層膜コーティングフィルタの場合、低屈折率と高屈折率の薄膜を層状とし、これを等価的に一枚の膜と見做したとき、入射角斜面と射出面との間で、いわゆるファブリペロ干渉計と同様に所望の透過は腔に対し光路長が $m \cdot \lambda / 2$  ( $m$ は整数)となるように膜厚と屈折率を設定することにより、所望の波長の光だけを透過できるようにする。しかし、この多層膜の製作上、所望の透過波長に対し、狭帯域で、かつ、カット性を良くするためには、膜の層数を多くする必要があることから、各膜厚と屈折率の精度を十分に上げなければならず、更に、膜の境界面における散乱による特性低下を防止する為、膜の面粗さ及び整合性を向上させなければならない等の技術的難点の存在が知られている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、フィルタ以外の手段により励起光をカットすることができるDNA塩基配列決定装置を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決するため、本発明では、DNA断片用の多数の泳動路を有する、垂直に保持される平板型ゲル電気泳動手段、該電気泳動装置の泳動路に、該電気泳動装置の横方向から該泳動路と直交するように、レーザ光を照射する光励起用のレーザ光照射手段、レーザ光によって照射されたDNA断片から発生された蛍光を検出し電気信号に変換する蛍光検出手段とからなるDNA塩基配列決定装置において、前記蛍光検出手段と泳動板との間に偏光板が設けられていることを特徴とするDNA塩基配列決定装置を提供する。前記偏光板はS偏光成分を遮断する偏光板である。

【0013】

【作用】散乱体であるゲルからの散乱光は励起光の偏光特性を保存し(直線偏光)、蛍光体による蛍光は偏光特性が解消する。本発明では、この特性に着目し、蛍光検出手段の前にP偏光板を配置することにより、励起光をカットし、蛍光だけを透過させることに成功した。

【0014】

【実施例】以下、図面を参照しながら本発明を更に詳細に説明する。

【0015】図1は本発明のDNA塩基配列決定装置の模式的構成を示す部分概要斜視図である。蛍光検出手段自体は特に限定されない。従来から光学式のDNA塩基配列決定装置において蛍光検出に使用されてきた蛍光検

出手段あるいは、それ以外の新規な構成を有する蛍光検出手段でも全て使用できる。

【0016】図1に示された蛍光検出手段は、図5に示された蛍光検出手段と類似して、集光レンズ10と受光素子12とから構成されている。この集光レンズ10と泳動板74との間に偏光板14が配置されている。言うまでもなく、蛍光検出手段はこの偏光板14を構成部品の一つとして包含することができる。従って、偏光板14の配設位置は図示されたものに限定されない。レンズ10と受光素子12との間であってもよい。更に、従来の波長カットフィルタと併用することもできる。

【0017】前記のように、本発明のDNA塩基配列決定装置で使用するレーザ光は波長488nmの直線偏光レーザである。このレーザ光がゲル電解質層を通過する際、ゲルからの散乱光は励起光の偏光特性を保存している。すなわち、散乱光は直線偏光である。これに対して、蛍光体からの蛍光は偏光方向が変化し、P偏光成分を多く含んでいる。すなわち、蛍光体からの蛍光は偏光特性が解消している。

【0018】従って、図2に示されるように、S偏光成分を遮断し、P偏光成分だけを透過させる偏光板を使用すると、波長488nmの励起用直線偏光レーザによる波長488nmのゲル散乱光は偏光板により遮断され、波長520nmの蛍光だけを透過させる。

【0019】これに対し、図3に示されるように、S偏光成分を透過させる偏光板を使用すると、ゲル散乱光および蛍光の両方とも透過してしまい所期の目的を達することができない。従って、本発明では必ずS偏光成分を遮断する偏光板を使用しなければならない。

【0020】偏光板自体は当業者に公知であり、特に説明を要しないであろう。従って、本発明の装置では従来から使用されている全ての偏光板を使用することができる。例えば、プラスチック偏光板などを好適に使用することができる。

【0021】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、偏光板を使用することにより、励起光と蛍光の波長が接近していても、蛍光だけを効果的に、しかも、確実に蛍光検出手段へ透過させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のDNA塩基配列決定装置の模式的構成を示す部分概要斜視図である。

【図2】P偏光成分を検出する偏光板の模式図である。

【図3】S偏光成分を検出する偏光板の模式図である。

【図4】特開昭63-21556号公報に開示されたDNA塩基配列決定装置の模式的構成図である。

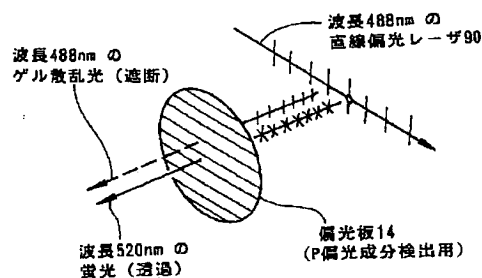
【図5】各泳動路毎に、フィルタ、集光レンズおよび受光素子からなる蛍光検出手段を配列したDNA塩基配列決定装置の一例の模式的構成図である。

【図6】波長488nmの励起光と波長520nmの蛍

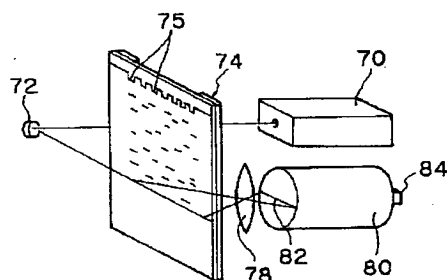
10 集光レンズ

#### 1 4 偏光板

【図 2】



【图 4】



【图 6】

